N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 1512

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ÈS SCIENCES (Naturelles)

présentée

A LA FALCULTÉ DES SCIENCES

de PARIS

par

Mr ***CHERMANN Jean Claude***

pour obtenir

le grade de Docteur Ès-Sciences

---

Sujet de la Thèse : *Les Antigènes des formes Rough des* ***Enterobacteriaceae*** *Séparation, nature chimique, propriétés toxiques et immunologiques.*

Soutenue le 24 Juin 1967 devant la Commission d'Examen

MM. **LEDERER E.** Président
**DUBERT J. M.** Examinateurs
**RAYNAUD M.**

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543920_0017

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4301. — Extrait Septembre 1967. — Tome **113**, pp. 375-398.)

# ÉTUDE DES DIVERS ANTIGÈNES ÉLABORÉS PAR *SALMONELLA TYPHI* ROUGH (SOUCHE $R_2$).

## II. - SÉPARATION ET PROPRIÉTÉS (*)

par J. C. CHERMANN, M. RAYNAUD et M. DIGEON (**) (***)

(avec la collaboration technique de J. RIZA et M. Cl. ROUZÉ)

*(Institut Pasteur, Annexe de Garches, I.N.S.E.R.M. et C.N.R.S.)*

## INTRODUCTION

Nous avons montré précédemment [**17**] que les préparations d'endotoxine rough obtenues par différentes méthodes [**37, 38**] à partir des corps microbiens de *S. typhi* rough (souche $R_2$) contenaient plusieurs antigènes. L'étude en immunodiffusion en gel de l'endotoxine $R_2$ brute, avec des sérums de chevaux anti-bactéries $R_2$ chauffées révèle quatre antigènes principaux que nous avons désignés par les notations $r_1$, $r_2$, $r_3$ et $r_4$. Ils sont accompagnés d'autres antigènes présents en très faible quantité et décelables seulement en utilisant de fortes concentrations [**17, 41**].

La purification de l'endotoxine $R_2$ par précipitation acétique suivie de traitement alcalin et précipitation alcoolique à basse température (toxine $R_2a$) [**4**] fait disparaître les antigènes $r_1$, $r_2$ et $r_3$, mais l'antigène $r_4$ qui subsiste se montre encore accompagné de trois antigènes différents de $r_1$, $r_2$, $r_3$ et que nous avons désignés par $r_5$, $r_6$ et $r_7$ [**17, 41**]. L'apparition de ces nouveaux antigènes paraissait s'expliquer par la concentration des antigènes présents en faible quantité dans les préparations de toxine $R_2$ brute.

Les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ sont communs aux formes smooth et aux formes rough des entérobactéries, c'est pourquoi nous les avons appelés antigènes hétérologues ; nous les avons retrouvés dans toutes

(*) Manuscrit reçu le 24 avril 1967.

(**) Ce travail constitue une partie d'une Thèse de Doctorat ès-Sciences soutenue en juin 1967 à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris par l'un d'entre nous (J. C. Chermann) et enregistrée au C. N. R. S. sous le n° AO 1512.

(***) Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I. N. S. E. R. M.)

UNIV. LEIDEN BIBL.

les préparations brutes d'endotoxine smooth ou rough, quelque fût leur mode d'obtention [17].

L'antigène $r_4$ se retrouve chez de nombreuses salmonelles rough, mais non chez toutes. Nous l'avons identifié [17] à l'antigène rough R II décrit par Beckmann [1, 2].

Les antigènes $r_5$ et $r_6$ sont seuls présents dans l'haptène acétique de *S. typhi* $R_2$ [17] obtenu par une méthode analogue à la méthode utilisée pour la préparation du polyoside O des formes smooth par hydrolyse acétique des bactéries selon la technique de Freemann.

Nous exposons ici la séparation du groupe des « antigènes hétérologues » $r_1$, $r_2$, $r_3$ d'une part, de l'antigène $r_4$ d'autre part, et leurs propriétés.

L'étude des antigènes $r_5$, $r_6$, $r_7$ n'est pas abordée ici car elle nécessite, étant donné la faible proportion de ces antigènes dans les préparations, la mise en œuvre de très grosses quantités d'endotoxine.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### A. Préparations antigéniques

Le mode de préparation des antigènes (toxine $R_2$ brute, toxine $R_2a$) a été décrit précédemment [17, 41].

### B. Sérums

Les sérums n° 269, 14788, 13475 (cheval 207) antibactéries $R_2$ tuées ; 13525 (cheval 127), anti toxine $R_2a$ et 90193 (cheval 725) anti bactéries *S. typhimurium* TV 119 sont les mêmes que dans le mémoire précédent [17].

### C. Techniques

1° Digestion par la pronase. — L'endotoxine $R_2$ est mise en solution à 1 p. 100 dans du tampon Tris 0,05 M de pH = 7,2, additionné de chlorure de calcium (Q. S.p. M/400). On ajoute la pronase (rapport enzyme/substrat = 1/100 (1). La protéolyse est faite sous toluène à 40° pendant soixante-douze à quatre-vingt-dix heures.

2° Filtration sur gel de Sephadex. — Nous avons utilisé surtout les Sephadex G-25 et G-200. Le gonflement des grains et le remplissage des colonnes ont été faits selon les indications du fabricant.

*Colonnes.* Pour les colonnes analytiques, nous avons utilisé des colonnes de Pharmacia en verre Quickfit de 2,5 × 45 cm ou de 2,5 × 100 cm avec adapteurs. Les colonnes préparatives ont été faites au laboratoire : colonnes de 3,5 × 115 cm avec adapteurs. Les colonnes préparées sont

(1) Pronase P de la Kaken Chemical Co Ltd à 45,000 PUK par g). Adresse : Marubeni I. Ida France : 39, rue Cambon, Paris (1er).

étalonnées par filtration de Bleu de Dextran 2000, de sérumalbumine bovine et de cytochrome C.

Elles sont contrôlées par le calcul des plateaux théoriques selon Glueckauf [21] adapté par Withaeker [54] et Flodin [20].

Sur les colonnes analytiques on dépose 100 mg de toxine dissous dans 5 ml ; sur les colonnes préparatives : 500 mg dissous dans 25 ml. L'élution est faite pour les colonnes de Sephadex G-25 avec de l'eau bidistillée (nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'adsorption de nos produits sur le Sephadex en faisant passer à la suite une solution molaire de NaCl) ; pour les colonnes de Sephadex G-200, avec une solution à 1 p. 1 000 de NaCl. L'effluent est recueilli sur collecteur de fractions, par fractions de 3 ml pour les colonnes analytiques, de 10 ml pour les colonnes préparatives. Les fractions recueillies sont étudiées au spectrophotomètre de Beckman (mesure de la densité optique à 280 mμ) et, pour certaines de nos expériences, par la réaction au phénol de Dubois [19] pour la recherche des hexoses. La mise en évidence des antigènes présents dans les fractions est faite par immunodiffusion en gel, et, dans certains cas, par les réactions d'inhibition de l'hémagglutination.

3° Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. — Nous avons employé la technique de Rude et Gœbel [45] modifiée par Kunin [26] sur des colonnes de 2,5 × 60 cm. L'élution est faite par un gradient de tampon Tris et de NaCl (Tris 0,05 M de pH = 8,0→Tris 0,3 M de pH = 7,3 additionné de NaCl 0,5 M). L'effluent est recueilli par fractions de 10 ml.

4° Immunodiffusion en gel. — Toutes les études ont été faites selon Ouchterlony par double diffusion en milieu gélosé à 1,5 p. 100 sur plaques ou en boîtes de Petri. Celles-ci ont été observées après un à cinq jours à 37° C selon les antigènes.

5° Hémagglutinations. — Nous avons utilisé des globules rouges formolés selon la méthode de Weinbach [50] telle qu'elle est appliquée par Butler [6]. La suspension mère à 10 p. 100 est conservée à + 4° en tampon isotonique (tampon phosphate + NaCl 0,150 M pH = 7,2 — formule de Stavitsky [47]).

Pour la sensibilisation, la suspension est diluée de manière à contenir $3,5.10^8$ hématies par ml (normalisation au spectrophotomètre selon Lavergne [30]), ce qui correspond à une suspension à 2,25 p. 100 de globules. Elle est ensuite diluée avec la solution d'antigène en eau physiologique de manière à obtenir une suspension d'hématies à 0,5 p. 100 et une concentration d'antigène de 1 mg/ml. Le contact globules-antigène est fait à la température du laboratoire pendant quinze minutes. Les hématies sensibilisées sont lavées trois fois et remises en suspension en eau physiologique. Les hématies ont été sensibilisées avec les polyosides alcalins $R_1b$ ou $R_2a$ dont le mode de préparation a été décrit précédemment [17, 41].

Les réactions d'hémagglutination ont été faites en plaques de plexiglas type O. M. S. en mélangeant 0,2 ml de sérum dilué (dilutions en progression géométrique de raison 2) et 0,2 ml de suspension globulaire. La lecture est faite après seize à vingt heures à la température du laboratoire.

6° Précipitations quantitatives. — Les courbes ont été effectuées selon la technique de Heidelberger et Kendall [24]. Les dosages d'azote ont été faits par la microméthode de Kjeldahl, la recherche de l'excès d'anticorps et d'antigène par immunodiffusion en gel et par hémagglutination.

7° Etude de la toxicité et du pouvoir pyrogène. — Les doses 50 p. 100 de mortalité ($DM_{50}$), ont été évaluées sur la droite log/prob suivant la méthode de Bonét-Maury et coll. [5]. Le pouvoir pyrogène a été apprécié par détermination de la dose minima pyrogène (DMP) évaluée sur la droite des écarts de température en fonction des doses (moyennes de plusieurs animaux) et définie comme la dose provoquant une élévation de température de 0,6° C.

8° Techniques chimiques. — Nous avons utilisé pour le dosage d'azote la méthode de Kjeldahl, pour le dosage du phosphore la méthode de Horecker [23], pour le dosage des hexoses la méthode au phénol de Dubois [19], pour le dosage du glucose et du galactose, la chromatographie quantitative selon Wilson [53], pour le dosage de l'heptose la méthode à la cystéine de Dische [18], pour le dosage des hexosamines la méthode de Rondle et Morgan [44], pour la recherche du KDO (acide 2-céto-3-désoxyoctonique) la méthode à l'acide thiobarbiturique de Weissbach et Hürvitz [51], pour l'identification des acides aminés la chromatographie en couche mince de cellulose [36, 55] ; pour le dosage des acides aminés la méthode de Moore et Stein.

## RÉSULTATS

### Séparation des antigènes

Les préparations d'antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ ont été obtenues soit à partir de la toxine $R_2$ brute, soit à partir des extraits cytoplasmiques, produits résiduels des préparations de parois bactériennes $R_2$, soit à partir d'extraits obtenus en traitant les germes $R_2$ par l'acide trichloracétique en solution N/4, selon Boivin. Dans tous les cas ce groupe d'antigènes a été séparé par filtration sur gel de Sephadex.

L'antigène $r_4$ pur a été obtenu par fractionnements de la toxine $R_2$ brute ou de la toxine $R_2a$.

A. Fractionnement de la toxine $R_2$ brute. — A côté des antigènes qui nous intéressent ici, la toxine $R_2$ brute contient plusieurs antigènes de nature protéique révélés par le sérum 13525 antitoxine $R_2a$ (voir pl. I, fig. 1), et en particulier l'antigène flagellaire H (d). On la débarrasse de ces antigènes protéiques par une digestion protéolytique par la pronase, à laquelle résistent les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ et $r_4$ (voir pl. I, fig. 3). La solution de toxine digérée est ensuite filtrée sur Sephadex G-25 (voir diagramme d'élution, fig. 1). Les peptides

et les restes de pronase passent dans la fraction incluse et sont éliminés. La fraction exclue contenant les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ et $r_4$ est recueillie, concentrée par ultrafiltration sur bougies collodionnées, ou par lyophilisation, puis passée sur colonne de Sephadex G-200. L'antigène $r_4$ (« $r_4$b ») passe dans la fraction exclue, les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ passent ensuite, d'abord $r_3$ puis un mélange des trois

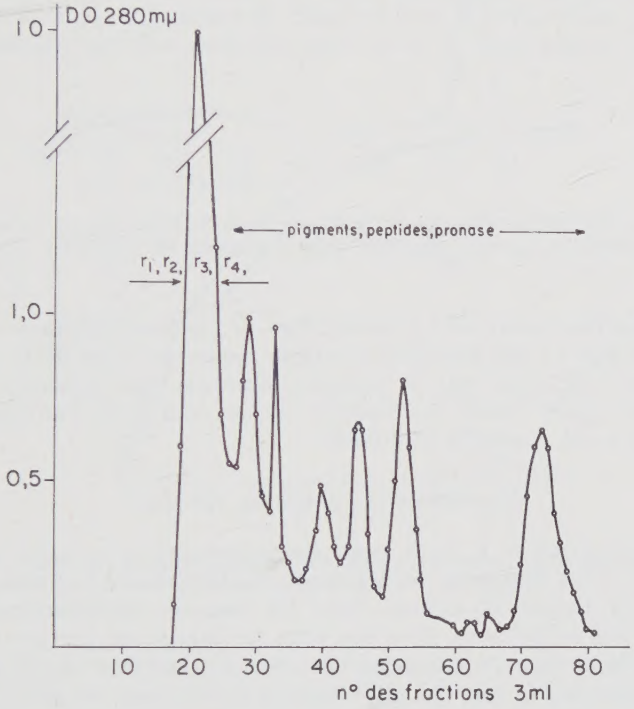


FIG. 1. — Diagramme d'élution de la toxine $R_3$b digérée par la pronase filtrée sur Sephadex G-25.

(voir diagramme d'élution, fig. 2). Ces derniers antigènes pourraient être séparés les uns des autres par des recyclages successifs, mais étant donné les grandes quantités de toxine $R_2$ et le nombre des opérations qui seraient nécessaires pour l'obtention de chacun de ces antigènes pur et de leur étude, nous nous sommes contentés, pour le moment, de purifier et d'étudier, d'une part, le groupe $r_1$, $r_2$, $r_3$, d'autre part, l'antigène $r_4$. Celui-ci est purifié par plusieurs filtrations successives sur Sephadex G-200. La pureté a été ensuite contrôlée par chromatographie sur DEAE-cellulose.

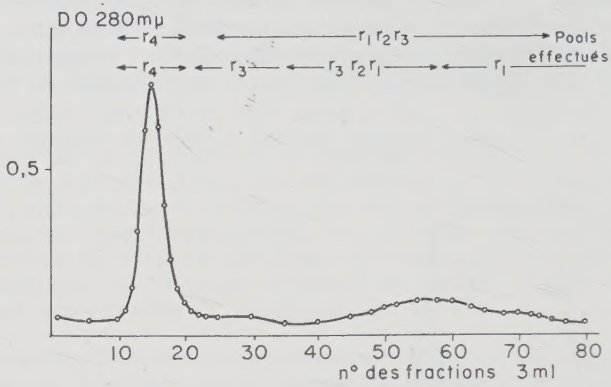


FIG. 2. — Diagramme d'élution de la filtration sur Sephadex G-200 du mélange d'antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$, $r_4$ (fraction 1 de la filtration sur Sephadex G-25).

B. FRACTIONNEMENT DE LA TOXINE $R_2a$. — Le fractionnement de la toxine « $R_2a$ » a été fait selon le même mode que celui de la toxine $R_2$ brute : digestion par la pronase, filtration sur Sephadex G-25 puis sur G-200. Seule la fraction exclue contenant l'antigène $r_4$ (« $r_4a$ ») a été recueillie et étudiée.

### PROPRIÉTÉS DES ANTIGÈNES $r_1$, $r_2$, $r_3$.

A. LES ANTIGÈNES $r_1$, $r_2$, $r_3$ SONT FAIBLEMENT LIÉS A LA PAROI BACTÉRIENNE. — Ces antigènes se détachent facilement de la paroi, puisqu'on les trouve abondants dans les extraits cytoplasmiques et même tout simplement dans les eaux de lavage de germes ou de parois. Cependant ils paraissent bien être des antigènes de la paroi : lorsque des parois ont été suffisamment lavées pour ne plus libérer de $r_1$, $r_2$, $r_3$ dans les eaux de lavage, on peut encore les extraire de ces parois par un traitement avec la solution chlorure-citrate de sodium, ou par la méthode phénol-eau.

B. ETUDE IMMUNOLOGIQUE DES PRÉPARATIONS PURIFIÉES $r_1$, $r_2$, $r_3$. — Nous avons montré [**10**] que les « antigènes hétérologues » $r_1$, $r_2$, $r_3$ communs à toutes les entérobactéries étudiées sont absolument distincts de « l'antigène commun » de Kunin [**26**, **27**] et que nous n'avions pas réussi à les fixer sur hématies. L'établissement de la courbe de précipitation quantitative des sérums 13475 et 14788 par une préparation purifiée de ce groupe d'antigènes, avec étude des surnageants en immunodiffusion en gel et par hémagglutinations (hématies sensibilisées avec le polyoside alcalin $R_2b$) confirme que les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ ne prennent aucune part dans l'hémaggluti-

nation : le titre hémagglutinant du sérum reste inchangé tout au long de la courbe, alors que disparaissent les anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$.

La comparaison des courbes obtenues avec ces deux sérums montre que le sérum 14788 est plus riche en anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$ (maximum d'azote anticorps précipité : 303 µg) que le sérum 13475 (maximum d'azote anticorps précipité : 132 µg). D'autre part, en faisant avec ce même sérum n° 14788 les courbes de précipitation quantitative avec la toxine $R_2$ brute et avec la préparation $r_1$, $r_2$, $r_3$, on constate que les anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$ représentent la plus

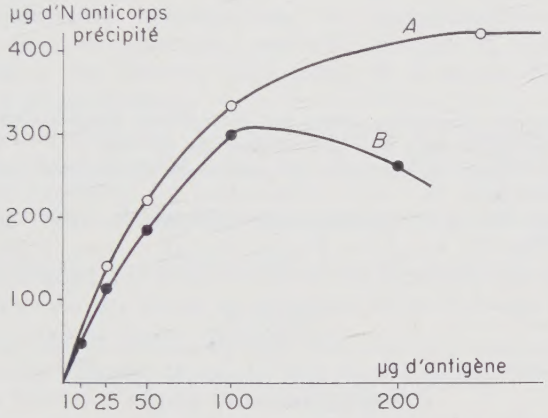


FIG. 3. — Courbes de précipitation quantitative du sérum 14788 avec la toxine $R_2$ brute (A) et avec une préparation purifiée d'antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ (B).

grande partie des anticorps de ce sérum (maximum d'azote anticorps précipité par la toxine $R_2$b : 426 µg, par la préparation $r_1$, $r_2$, $r_3$ : 303 µg) [voir courbes fig. 3]. Il est à noter que si on sépare les euglobulines de ce sérum, les anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$ passent entièrement dans cette fraction.

C. CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES. — Les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ ne sont pas sédimentables par ultracentrifugation. Ils n'absorbent pas ou très peu en ultra-violet et ne donnent en tout cas aucun spectre caractéristique. Les résultats des analyses chimiques sont résumés dans les tableaux I et II. L'étude des lipides n'a pas encore pu être faite. Les résultats de l'analyse globale du mélange des antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$, encore incomplets en raison du manque de matériel et des difficultés de leur préparation, fournissent cependant une indication sur leur nature chimique. Les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ ou certains d'entre eux seulement sont vraisemblablement des lipoprotéines. La

TABLEAU I. — **Analyse chimique des antigènes.**

| | ANTIGÈNES $r_1, r_2, r_3$ | ANTIGÈNE $r_4 b$ |
|---|---|---|
| Azote | 8,40 | 8,23 |
| Phosphore | 1,40 | 4,3 |
| Hexoses | 8,21[1] | 19,3 |
| Glucose | 1,65 | 2,5 |
| Galactose | 0[2] | 6,0 |
| Hexosamine | 2,50 | 10,0 |
| Heptose | 0 | 11,4[4] |
| KDO | 0 | 2[3] |
| Cendres | 12,5 | — |

1 = Substances réductrices dosées par la méthode HAGUEDORN.
2 = Non décelable dans une prise d'essai de 500 µg.
3 = Chiffre calculé en utilisant les coefficients d'absorption fournis par OSBORN [34].
4 = Dosage effectué en prenant comme référence le L-glycéro-D-manno-heptose.

TABLEAU II.

| ANALYSE DES AMINO-ACIDES DU GROUPE DES ANTIGÈNES $r_1$, $r_2$, $r_3$ | |
|---|---|
| Acide aspartique | 1,50 |
| Thréonine | 3,06* |
| Sérine | 0,38* |
| Acide glutamique | 4,67 |
| Proline | 1,22 |
| Glycine | 2,45 |
| Alanine | 1,03 |
| 1/2 Cystine | 0,09 |
| Valine | 4,83 |
| Méthionine | 1,25 |
| Isoleucine | 3,45 |
| Leucine | 5,05 |
| Tyrosine | 0,17 |
| Phénylalanine | 1,63 |
| Lysine | 5,69 |
| Histidine | 0,32 |
| N (amidé) | 0,76 |
| Arginine | 1,25 |
| Glucosamine | 1,25* |
| Total | 38,71 |

* Valeur extrapolée à t = 0.

fraction polypeptidique représente seulement 38,7 p. 100 de la masse totale et se caractérise par l'absence de cystine et la présence d'une très faible quantité de tyrosine.

Il importe cependant de séparer complètement ces trois antigènes les uns des autres avant de pouvoir affirmer qu'ils possèdent tous trois des structures analogues.

### Propriétés de l'antigène $r_4$

A. L'antigène $r_4$ est hétérogène. — Nous avons constaté que nos préparations purifiées d'antigène $r_4$ étaient hétérogènes et qu'elles étaient différentes chimiquement et immunologiquement selon qu'elles avaient été obtenues à partir de la toxine $R_2$ brute (antigène « $r_4b$ » 8,2 p. 100 d'azote) ou à partir de la toxine $R_2a$ (antigène « $r_4a$ » 1,8 p. 100 d'azote).

1° *Ultracentrifugation.* Les préparations $r_4b$ donnent un large pic, signe d'hétérogénéité, dont le « S » moyen calculé est égal à 52,9 unités Svedberg. La préparation « $r_4a$ » se montre encore plus hétérogène : elle contient trois constituants dont les constantes de sédimentation sont : 32,73 S, 18,57 S et 3,31 S (Il paraît anormal qu'un constituant 3,31 S ait été exclu sur Sephadex ; il est probable que sa faible densité réduit sa migration dans le champ de centrifugation ; il s'agirait d'une lipoprotéine).

2° *Immunodiffusion en gel.* L'étude de ces préparations $r_4$ avec les différents sérums confirme cette hétérogénéité.

La préparation « $r_4b$ » donne avec chacun des sérums 13475 et 90193 une ligne unique, avec un raccord total de l'une à l'autre ; au contraire, elle donne avec le sérum 13525 deux lignes bien distinctes qui se raccordent toutes deux avec la ligne unique donnée par les deux premiers sérums (voir pl. I, fig. 2). Ceci nous conduit à penser que la préparation $r_4b$ contient au moins deux types de molécules portant au moins un déterminant commun et un déterminant différent que nous avons désignés pour la commodité de l'exposé par *x*, *y* et *z*, *z* étant le déterminant commun. Lorsqu'on étudie l'antigène $r_4b$ en immunoélectrophorèse, on constate que les deux constituants antigéniques *xz* et *yz* chargés négativement se déplacent avec la même vitesse électrophorétique (voir pl. I, fig. 5).

La préparation « $r_4a$ » étudiée avec les mêmes sérums se comporte différemment. Elle donne une ligne avec le sérum 13475 et une seule ligne *y* avec le sérum 13525 (se raccordant à la ligne *y* de l'antigène $r_4b$ (voir fig. 4) ; en revanche, elle donne trois lignes avec le sérum 90193 (l'une raccordée aux précédentes *z* et deux autres que nous désignons par *u* et *v*, (voir pl. I, fig. 4). Certaines préparations donnent même 4 lignes (*z*, *u*, *v* et *w*).

Lorsqu'on fait l'immunoélectrophorèse, les trois constituants migrent en même temps (voir pl. I, fig. 6).

3° *Précipitation quantitative.* Lorsqu'on fait la courbe de précipitation quantitative du sérum 13525 avec les préparations $r_4b$ et $r_4a$, on constate dans les deux cas que les anticorps anti *y* descendent

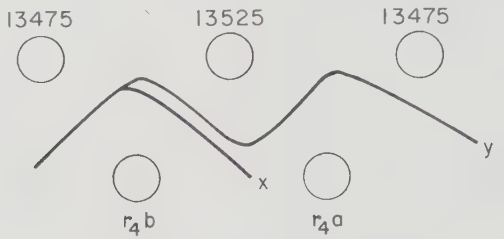


FIG. 4. — Schéma d'immunodiffusion en gel montrant les réponses différentes des préparations $r_4b$ et $r_4a$ avec le sérum antitoxine n° 13525.

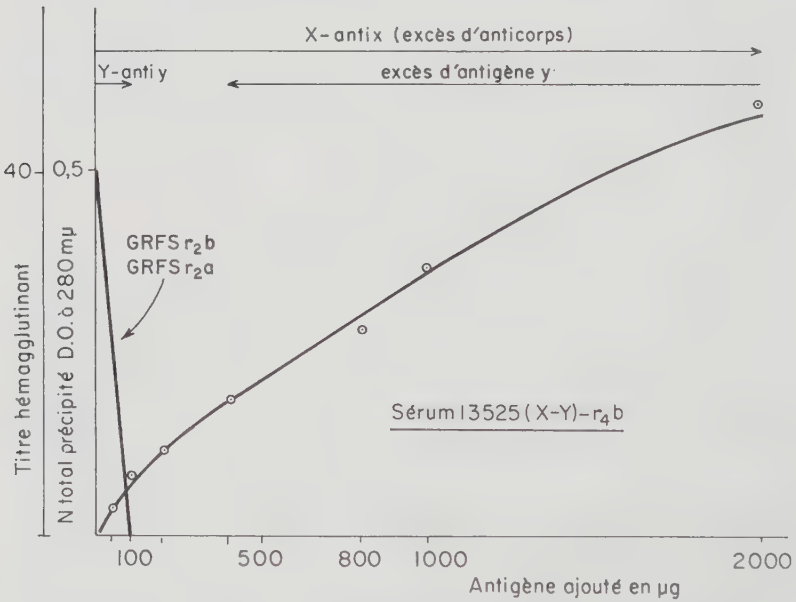


FIG. 5. — Courbe de précipitation quantitative du sérum 13525 avec l'antigène $r_4b$.

très rapidement, laissant subsister les anticorps anti *x* et que le titre hémagglutinant du sérum (hématies sensibilisées par les polyosides alcalins $R_2b$ et $R_2a$) s'annule en même temps que disparaissent les anticorps anti *y* (voir fig. 5).

B. HÉMAGGLUTINATION PASSIVE. — Nous avons montré précédemment [17] que les fractions contenant l'antigène $r_4$, obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose étaient capables, après traitement alcalin, de sensibiliser les hématies. Nous avons vérifié que les préparations $r_4b$ et $r_4a$ purifiées par filtration sur gel de Sephadex possédaient aussi cette propriété. L'antigène $r_4$ est responsable de l'hémagglutination des globules rouges sensibilisés par les polyosides alcalins $R_2b$ et $R_3a$, tandis que les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ n'y prennent aucune part.

C. ÉTUDE CHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DE L'ANTIGÈNE $r_4b$. — L'analyse immunologique précédente nous a fait penser que l'hétérogénéité

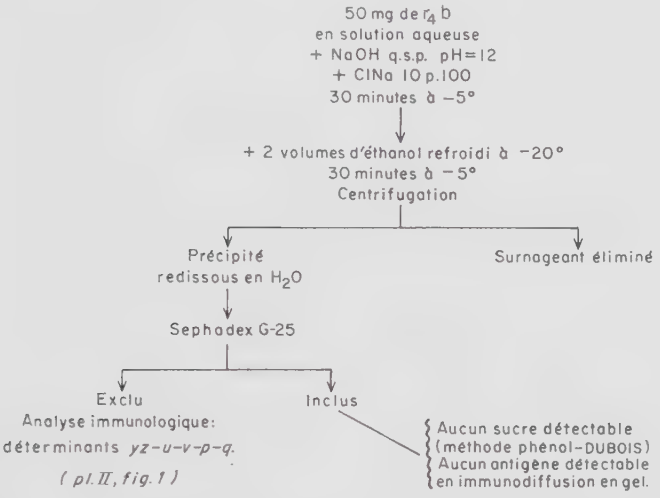


SCHÉMA 1 — *Traitement alcalin de $r_4b$ et précipitation alcoolique à basse température.*

des préparations $r_4a$ correspond à une dégradation de l'antigène $r_4b$. Nous avons fait seulement les analyses chimiques préliminaires de l'antigène $r_4b$ dont les résultats sont portés sur le tableau I, et nous avons étudié l'influence de diverses hydrolyses alcalines et acides de l'antigène $r_4b$ sur son comportement immunologique.

1° *Traitement alcalin de l'antigène $r_4b$ et précipitation par l'alcool à basse température.* Nous avons fait subir à l'antigène $r_4b$ un traitement alcalin suivi de précipitation alcoolique, analogue au traitement utilisé pour la préparation de la toxine $R_3a$. L'expérience est résumée sur le schéma 1. Ce traitement fait disparaître le détermi-

nant *x* de l'antigène $r_4b$, tout en laissant subsister les déterminants *y* et *z*. Par contre, il fait apparaître de nouveaux déterminants : le sérum 13525, outre la ligne *y*, donne deux nouvelles lignes *p* et *q*, au ras du réservoir antigène.

Le sérum 90-193, outre la ligne *z* donne deux nouvelles lignes *u* et *v* (voir pl. II, fig. 1). On retrouve une image assez voisine de celle que donne la préparation $r_4a$ ; cependant on remarque que celle-ci ne comporte pas les lignes *p* et *q* observées ici. Il se pourrait qu'elles correspondent à des molécules protéiques préservées de la digestion par la pronase lorsqu'elles sont combinées dans la toxine $R_2b$ d'où est isolé l'antigène $r_4b$ et au contraire détruites par cette enzyme lorsqu'elles sont détachées par le traitement alcalin dans les préparations de toxine $R_2a$, ce qui expliquerait leur absence dans l'antigène $r_4a$.

2° *Traitement alcalin de l'antigène $r_4b$ à 37° ou 56°.* Nous avons étudié l'effet du traitement alcalin constamment utilisé pour préparer les antigènes en vue de les fixer sur les hématies pour les réactions d'hémagglutination. L'antigène $r_4b$ a été traité par la soude 0,25 N selon les techniques de préparation des polyosides alcalins [**1**, **29**], soit deux heures à 37°, soit une heure à 56°. Les résultats obtenus dans les deux cas sont similaires. Comme précédemment, l'antigène $r_4$ ainsi traité perd le déterminant *x* tout en conservant *y* et *z* et on voit apparaître les trois déterminants *u*, *v* et *w* révélés par le sérum 90-193 (voir pl. II, fig. 2). On ne retrouve pas les deux déterminants *p* et *q*. De plus la ligne unique que donnait le sérum 13475 est remplacée par deux lignes : nous désignons par *r* et *s* les déterminants correspondants.

3° *Traitement par la baryte à froid.* L'antigène $r_4b$ a été traité par la baryte à 0° dans les conditions expérimentales de Rebers et

PLANCHE I.

Fig. 1. — Immunodiffusion en gel de la toxine $R_2b$ avec différents sérums.

Fig. 2. — Immunodiffusion en gel de la préparation d'antigène $r_4b$ avec différents sérums. Hétérogénéité révélée par le sérum 13525.

Fig. 3. — Image de la toxine $R_2b$ après digestion par la pronase : les antigènes protéiques révélés par le sérum 13525 ont disparu.

Fig. 4. — Etude de la préparation d'antigène $r_4a$ avec différents sérums. Hétérogénéité révélée par le sérum 90193.

Fig. 5. — Immunoélectrophorèse de la préparation $r_4b$.

Fig. 6. — Immunoélectrophorèse de la préparation $r_4a$.

Sérums : 269, 90319 antibactéries *S. typhi* $R_a$ (un mois d'immunisation) 13475 antibactéries *S. typhi* $R_a$ (10 séries d'injections immunisantes). 90193 antibactéries *S. typhimurium* TV 119 (antigène R II), 13525 antitoxine $R_2a$.

*N.-B. :* Sur la figure 3, le réservoir de droite en haut marqué par erreur 13475 contient, comme celui du haut, du sérum 90.193.

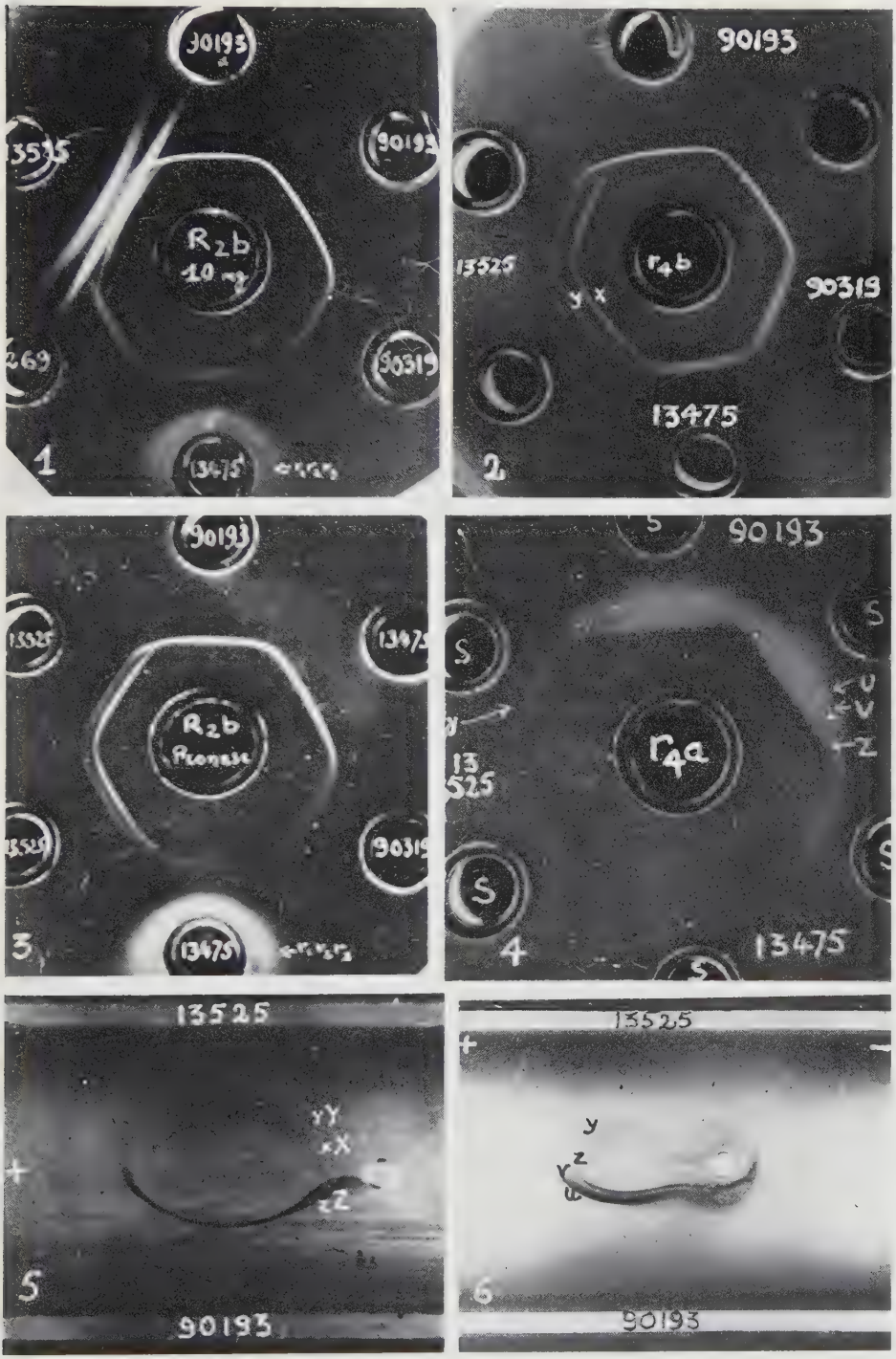
90193
13525
90193
R2b
10 mn
269
90319
1
13475
90193
13525
r4b
y x
90319
13475
2
90193
13525
13475
R2b
Pronase
90319
3
13475
90193
S
13
525
r4a
U
V
Z
S
4
13475
13525
Y
X
Z
5
90193
13525
+
−
y
z
6
90193

Planche I.

## PLANCHE II.

*Modifications immunologiques subies par l'antigène $r_4b$ après différents traitements.*

Fig. 1. — Traitement alcalin (pH = 12) et précipitation alcoolique à basse température (— 5°) [mode opératoire utilisé pour la préparation de la toxine $R_3a$].

Fig. 2. — Traitement par la soude 0,25 N une heure à 56° (mode utilisé pour la préparation des polyosides alcalins employés pour les réactions d'hémagglutination).

Fig. 3. — Traitement de l'antigène $r_4b$ par la baryte à froid (0°). [Précipité redissous.]

Fig. 4. — Traitement de l'antigène $r_4a$ par la baryte. [Précipité redissous.]

Fig. 5. — Traitement par l'hydroxylamine.

Fig. 6. — Hydrolyse acétique courte (vingt minutes à 100° à pH = 3,4).

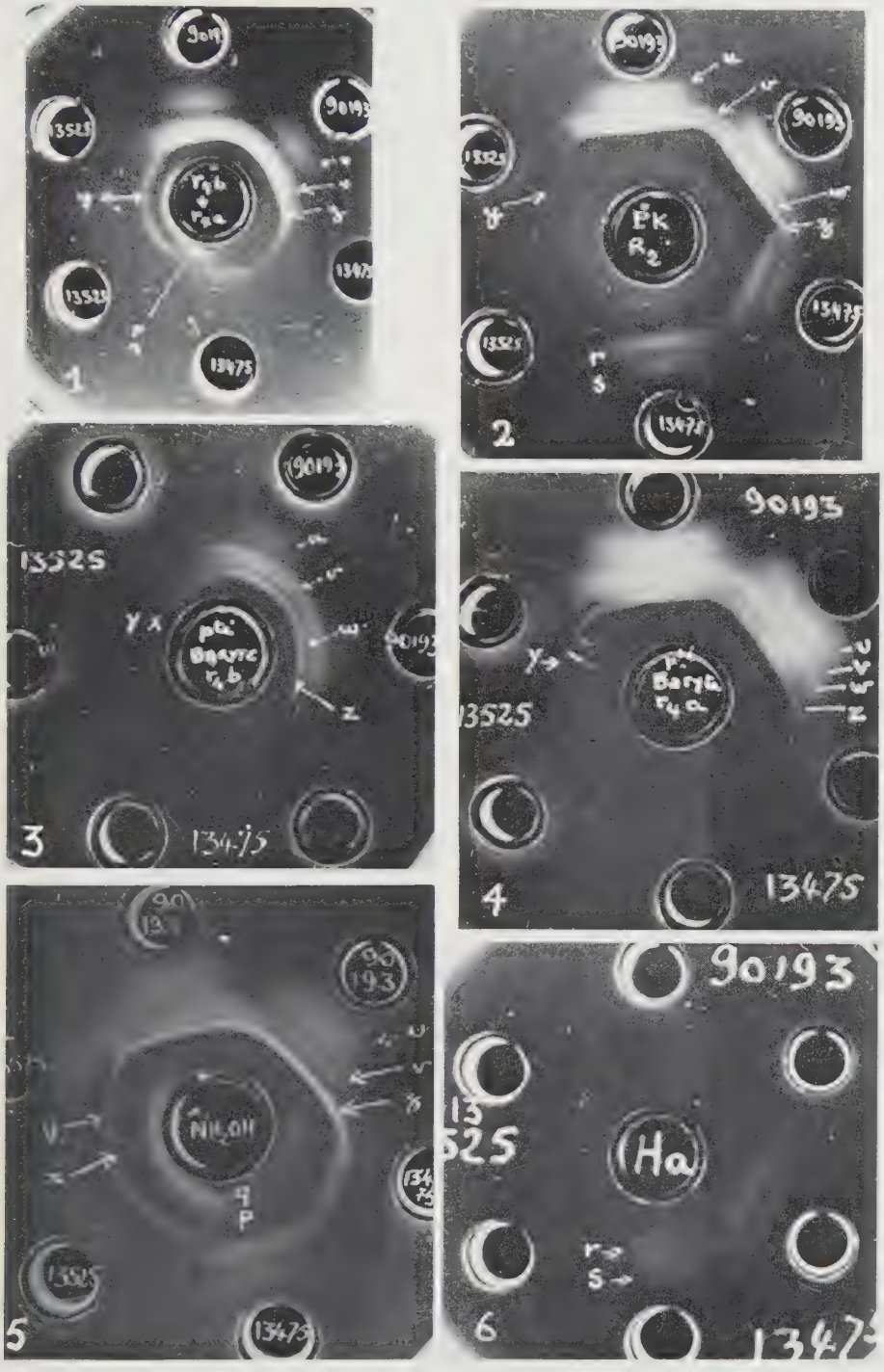


PLANCHE II.

Heidelberger [**42, 43**], puis passé sur colonne de Sephadex G-25. L'étude des fractions en immunodiffusion en gel et dans les réactions d'inhibition de l'hémagglutination a été complétée par l'analyse des sucres (réaction de Dische à la cystéine). L'expérience et les résultats sont résumés sur le schéma 2.

Comme dans les cas précédents, on observe des coupures de la molécule et l'apparition des déterminants : *u, v, w* (voir pl. II, fig. 3). Le même traitement appliqué à l'antigène $r_4$a donne un résultat similaire (voir pl. II, fig. 4).

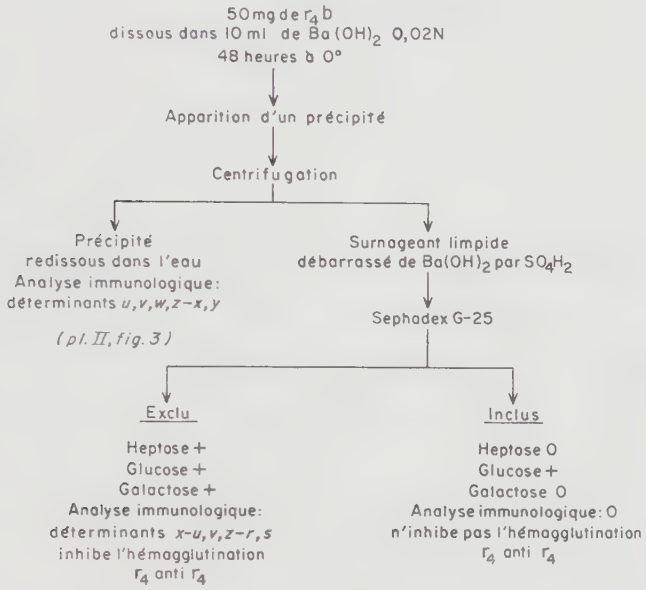


Schéma 2. — *Traitement de l'antigène $r_1$b par la baryte à froid.*

4° *Traitement de l'antigène $r_1$b par l'hydroxylamine.* Nous avons montré antérieurement [**38**] que l'on peut extraire l'endotoxine des corps microbiens en les traitant par une solution normale d'hydroxylamine (neutralisée à pH = 7,0) pendant une heure à 38°. D'autre part, l'endotoxine granulaire $R_2$ préparée à partir de germes « stabilisés » par le dodécylsulfate de sodium [**11, 39, 40**] fournit également une toxine soluble lorsqu'on la traite de la même façon par l'hydroxylamine [**12**]. Partant de ces données, nous avons expérimenté dans les mêmes conditions l'action de l'hydroxylamine sur la préparation $r_1$b. Après action de l'hydroxylamine, on observe l'appa-

rition d'un précipité qui paraît dû à la libération d'acides gras. Repris par un mélange eau-chloroforme, ce précipité s'y dissout en grande partie. L'analyse immunologique de la phase aqueuse par les réactions de précipitation en gel, révèle l'apparition des déterminants *u* et *v* (sérum 90193) et *p* et *q* (sérum 13525) (voir pl. II, fig. 5). Après filtration sur gel de Sephadex G-200, l'analyse immunologique montre que ces déterminants sont répartis à la fois dans la fraction exclue et dans la fraction incluse dans la zone de poids moléculaires compris entre 60 000 et 100 000.

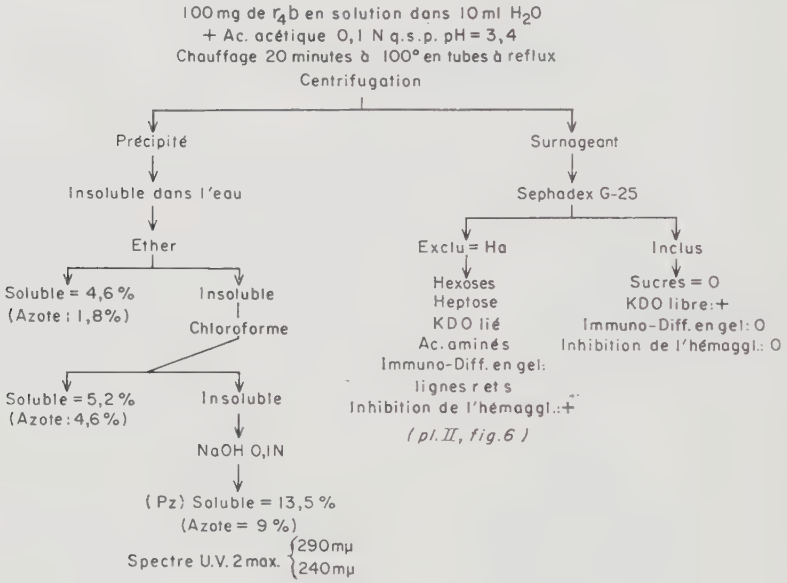


Schéma 3. — *Hydrolyse acide ménagée.*

5° *Hydrolyse acide ménagée et progressive.* Nous avons effectué sur la préparation $r_4b$ une hydrolyse acétique ménagée (pH = 3,4 pendant vingt minutes à 100°) dans les conditions utilisées par Grollman et Osborn [**22**] (voir schéma 3). Il se forme un précipité que son étude révèle constitué de lipides et d'une protéine analogue par son spectre à la protéine conjuguée de Morgan [**31**]. Cette protéine (Pz) présente deux maxima d'absorption dans l'ultraviolet, l'un à 290 mμ, le deuxième plus élevé à 240 mμ. La partie soluble a été filtrée sur Sephadex G-25 et les fractions ont été étudiées au point de vue chimique : recherche des hexoses par la méthode au phénol de Dubois, du KDO et des acides aminés — aucune absorp-

tion en U. V. (voir fig. 6), et au point de vue immunologique : précipitations en gel et inhibition de l'hémagglutination. On constate qu'une partie du KDO est libérée et passe dans la fraction incluse tandis qu'une autre partie reste liée et se trouve dans la fraction exclue. Nous avons trouvé aussi dans cette fraction exclue les sucres et tous les acides aminés sauf tyrosine et cystéine.

L'étude immunologique montre que l'hydrolyse acétique à pH

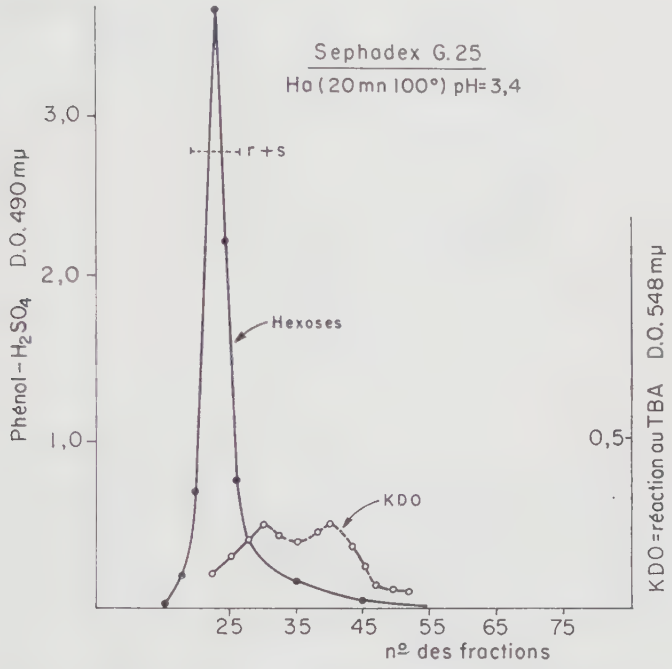


Fig. 6. — Diagramme d'élution de la filtration sur Sephadex G-25 de la fraction Ha obtenue après hydrolyse acétique courte :
● = dosage des hexoses ;
○ = dosage du KDO.

= 3,4 pendant vingt minutes à 100° coupe la molécule de l'antigène $r_4$ ; elle lui fait perdre les déterminants *x*, *y* et *z* (absence de réaction avec les sérums 13525 et 90193) et fait apparaître deux nouveaux déterminants révélés par le sérum 13475 (voir pl. II, fig. 6). Ces molécules antigéniques sont encore capables d'inhiber l'hémagglutination des hématies sensibilisées par le polyoside alcalin.

Cette fraction exclue sur Sephadex G-25 (fraction Ha du schéma 3) a ensuite été concentrée par ultrafiltration sur bougies collodionnées,

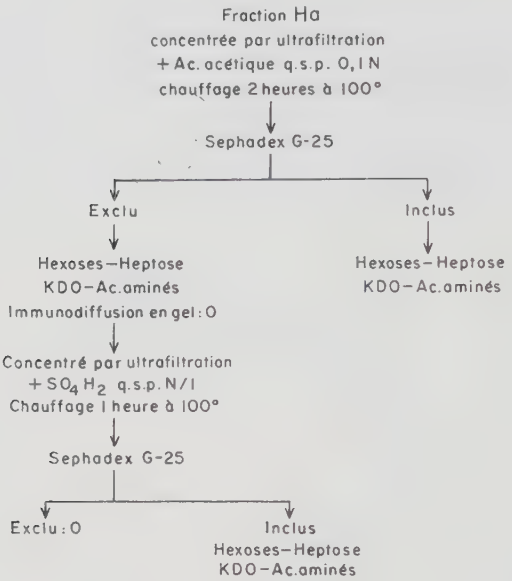


Schéma 4. — *Hydrolyse acide progressive.*

puis soumise à une nouvelle hydrolyse acétique analogue à celle qui est utilisée pour la préparation des polyosides acétiques [**35**, **46**] (acide acétique 0,1 N, chauffage deux heures à 100°). L'expérience est résumée sur le schéma 4. On constate que, même après cette hydrolyse plus longue, il reste une fraction exclue sur Sephadex G-25 contenant encore polyoside, KDO et acides aminés. Ce résultat montre que les acides aminés sont fortement liés aux sucres et il s'accorde avec l'impossibilité que nous avions précédemment rencontrée [**41**] d'obtenir par hydrolyse acétique des germes un haptène acétique rough correspondant au polyoside rough, comme Freemann a obtenu le polyoside O des souches smooth.

L'hydrolyse donnant naissance à des fractions de faible poids moléculaire incluses en Sephalex G-25 a été faite en acide sulfurique N/1 pendant une heure à 100° (voir schéma 4).

### Propriétés biologiques des antigènes $R_1$, $R_2$, $R_3$ et $R_4$

A. Toxicité. — 1° *Antigène* $r_4$. Cet antigène $r_4$ est toxique pour le lapin, la souris et l'embryon de poulet.

Chez l'embryon de poulet, nous l'avons expérimenté dans les conditions déjà utilisées pour la toxine $R_2$ [**16**] en injections intraveineuses faites au dixième jour de l'incubation. Nous avons observé

que, dans ces conditions, les préparations $r_4b$ étaient nettement plus toxiques que les préparations $r_4a$. La $DM_{50}$ de l'antigène $r_4b$ est de 0,002 µg alors que celle du $r_4a$ est de 0,009 µg, du même ordre que celle de la toxine $R_2$ brute ou $R_2a$ ($DM_{50}$ 0,007 à 0,010 µg).

Les souris sont beaucoup moins sensibles aux endotoxines ; cependant Chedid [7, 8] a montré que l'ablation des surrénales abaissait considérablement leur résistance. La préparation $r_4b$ tue les souris surrénalectomisées à la dose de 0,01 µg.

L'intoxication du lapin par l'antigène $r_4b$ purifié se montre différente de celle qu'entraîne la toxine $R_2$. Après une injection intraveineuse de 100 µg/kg d'animal, on observe, comme dans le cas de la toxine $R_2$, une hyperthermie transitoire, suivie d'hypothermie [15] et une leucopénie suivie de leucocytose. Mêmes phénomènes respiratoires (dyspnée) et nerveux [14] (tuphos, catatonie : l'animal, très prostré, reste dans les positions anormales où on le place ; mis sur le dos, il ne se retourne pas). Mais si les phénomènes nerveux sont les mêmes, ils paraissent plus accentués qu'avec la toxine $R_2$ ; par contre les symptômes intestinaux font défaut (pas de diarrhée) et la vasoconstriction des vaisseaux périphériques est beaucoup moins accusée que lors de l'intoxication par la toxine $R_2$.

L'antigène $r_4b$ traité par l'hydroxylamine, puis débarrassé des constituants lipidiques par le chloroforme, reste toxique pour le lapin avec les mêmes troubles nerveux non accompagnés de phénomènes intestinaux.

Nous avons étudié chez le lapin le pouvoir pyrogène des préparations $r_4b$ et $r_4a$ et l'avons comparé à celui de l'endotoxine $R_2$ [15] et de l'endotoxine granulaire [12] (voir tableau III).

Nous observons que l'antigène $r_4$ isolé, aussi bien $r_4a$ que $r_4b$, est moins pyrogène que l'endotoxine $R_2a$. D'autre part, nous consta-

TABLEAU III. — **Toxicité et pouvoir pyrogène.**

| | EMBRYON DE POULET $DM_{50}$ (en µg) | LAPIN D.M.P. (en µg/kg) |
|---|---|---|
| Toxine $R_2b$ | 0,007 | 0,0005 |
| Toxine $R_2a$ | 0,010 | 0,0250 |
| Antigène $r_4b$ | 0,002 | 0,0030 |
| Antigène $r_4a$ | 0,009 | |
| $r^1$, $r_2$, $r_3$ | 0,200 (1)<br>3,5 (2) | ~ 0,100 (1) |
| Granules $R_2$ | 24,000 | 0,0400 |

(1) $r_1$, $r_2$, $r_3$ isolé dans ce travail par gel filtration sur Sephadex G-200.
(2) $r_1$, $r_2$, $r_3$ isolé par chromatographie sur DEAE-cellulose [17].

tons que, si la préparation de $r_4b$ est plus toxique pour l'embryon de poulet que celle de $r_4a$, elle est au contraire nettement moins pyrogène pour le lapin.

2° *Antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$.* Le groupe des antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ a été étudié globalement au point de vue toxicité pour l'embryon de poulet et pouvoir pyrogène chez le lapin. La préparation $r_1$, $r_2$, $r_3$ séparée par filtration sur Sephadex s'est montrée toxique pour l'embryon de poulet ($DM_{50}$ = 0,2 µg) et pyrogène pour le lapin à la dose de 0,1 µg. Mais il suffit d'une contamination de seulement 1 p. 100 de $r_4$ pour avoir cette toxicité sur l'embryon et l'immunisation de lapins avec cette préparation $r_1$, $r_2$, $r_3$ en vue de l'étude de son pouvoir immunogène nous a en effet révélé la réalité de cette contamination.

B. Pouvoir immunogène. — 1° *Antigène $r_4$.* L'antigène $r_4$ est très immunogène. Une seule injection au lapin avec adjuvant de Freund suscite la formation d'anticorps précipitants. Ces anticorps apparaissent également très vite chez le cheval immunisé avec les bactéries chauffées : après une seule semaine (deux injections) le sérum commence déjà à donner la ligne $r_4$. Il faut d'ailleurs noter que cet anticorps se trouve déjà présent naturellement chez quelques animaux avant toute immunisation.

2° *Antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$.* Les antigènes $r_1$, $r_2$, $r_3$ sont au contraire très peu immunogènes. Les anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$ n'apparaissent que très tardivement après hyperimmunisation des chevaux par des bactéries tuées. De plus, leur apparition est très irrégulière, de nombreux chevaux ne donnent pas ces anticorps malgré la prolongation et la multiplication des injections.

Nous avons tenté d'immuniser des lapins avec une préparation de $r_1$, $r_2$, $r_3$ obtenue par filtration de toxine $R_2$ sur Sephadex. Nous avons injecté cette préparation mélangée à l'adjuvant de Freund (injections intradermiques dans les espaces interdigitaux des quatre pattes des lapins). Le sérum prélevé un mois après et étudié en immunodiffusion en gel ne révélait aucun anticorps anti $r_1$, $r_2$, $r_3$ mais seulement des anticorps anti $r_4$, témoignant de la contamination de la préparation $r_1$, $r_2$, $r_3$, utilisée pour l'immunisation, par des traces de $r_4$ qui n'avaient pu être détectées.

## DISCUSSION

Travaillant sur diverses endotoxines extraites de salmonelles smooth ou rough par différentes méthodes (solution hypertonique NaCl-citrate, acide trichloracétique selon Boivin, phénol-eau selon Westphal), nous avons montré qu'elles étaient toutes antigéniquement complexes [17]. Leur étude en immunodiffusion en gel avec

des sérums appropriés révèle toujours plusieurs antigènes : les antigènes hétérologues $r_1$, $r_2$, $r_3$ communs aux formes smooth et aux formes rough et l'antigène lourd R ou O selon les souches. Nous montrons dans ce travail que les antigènes hétérologues peuvent être séparés de l'antigène lourd $r_4$ de l'endotoxine rough de *S. typhi* $R_2$ par filtration sur gel de Sephadex.

Chedid et Skarnes [**9**] ont également utilisé cette méthode pour purifier l'antigène O lourd. De leur côté, Beer et coll. [**3**] étudiant une endotoxine d'*E. coli*, préparée selon Boivin, ont mis en évidence, par immunodiffusion en gel avec un sérum antibactérien, trois antigènes distincts qu'ils séparent au moyen de l'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Suzuki [**48**] isole l'antigène O lourd de l'antigène commun de Kunin par des précipitations par l'alcool. Nowotny et coll. [**33**] ont démontré aussi la complexité des préparations d'endotoxines et les ont fractionnées par chromatographie.

L'étude des antigènes que nous avons séparés nous montre en outre que l'antigène rough lourd $r_4$, identifié à l'antigène R II de Beckmann [**17**] est lui-même hétérogène.

Les différents traitements alcalins et les analyses en immunodiffusion en gel avec plusieurs sérums antibactériens et anti-endotoxine nous ont révélé sa complexité et le grand nombre de déterminants antigéniques qu'il porte. Il faut mentionner les profonds remaniements de structure et les coupures de la molécule provoqués par ces traitements alcalins, démasquant de nouveaux déterminants antigéniques.

Notons en particulier l'importante modification immunologique apportée à l'antigène $r_4b$ par le traitement alcalin appliqué pour la préparation des « polyosides alcalins » constamment utilisés pour les réactions d'hémagglutination. L'étude parallèle des antigènes précipitants en gel ainsi révélés et des antigènes impliqués dans les réactions d'hémagglutination passive sera reprise ultérieurement.

Le traitement de l'antigène $r_4b$ par l'hydroxylamine apporte aussi d'importantes modifications de la molécule : il démasque les mêmes déterminants que l'hydrolyse alcaline ; il permet de détacher des lipides et d'obtenir une substance précipitable par l'acide trichloracétique capable de provoquer la mort des embryons de poulet et l'intoxication des lapins avec des phénomènes nerveux.

L'hydrolyse acide apporte une dégradation de l'antigène $r_4b$ beaucoup plus sévère. Dès vingt minutes d'hydrolyse acétique à pH 3,4, il ne subsiste plus que deux déterminants antigéniques, tous les autres ayant disparu. L'étude des fractions montre qu'il y a eu séparation de lipides faiblement liés (éthérosolubles), du lipide A et d'une protéine analogue à la protéine conjuguée décrite par Morgan [**31**]) avec libération de KDO. Ce résultat est en accord avec les données d'Osborn [**34**] montrant que la liaison KDO-lipide A est acidosensible. Knox [**25**] a réalisé une expérience d'hydrolyse

acide similaire sur du lipopolysaccharide d'*E. coli* rough (ATCC 12408). Il a isolé le KDO et a montré qu'il était le déterminant principal de l'antigène de cette souche. Le KDO inhibait en effet la réaction de précipitation du lipopolysaccharide de cette souche avec un sérum antibactérien de lapin et la perte des propriétés immunologiques de ce lipopolysaccharide était parallèle à la libération du KDO par l'hydrolyse acide. Nous avons cherché à savoir si le KDO isolé par l'hydrolyse acide du $r_4$b représentait également un déterminant important de notre antigène et intervenait dans l'hémagglutination ; nous l'avons utilisé comme inhibiteur de la réaction d'hémagglutination en utilisant des doses dix fois plus élevées que celles de Knox et nous n'avons constaté aucune inhibition. Il ne semble donc pas intervenir dans les systèmes antigéniques de notre préparation d'endotoxine rough mis en jeu dans l'hémagglutination. Il n'inhile pas non plus la précipitation en gel.

Les résultats de l'expérimentation des effets toxiques sur l'animal et l'embryon de poulet des antigènes isolés comparés à ceux de l'endotoxine appellent divers commentaires : l'antigène $r_4$ provoque chez le lapin les mêmes troubles nerveux que l'endotoxine, mais les symptômes intestinaux font défaut. D'autre part, en comparant les propriétés pyrogènes chez le lapin et le pouvoir létal pour l'embryon de poulet, nous observons qu'ils sont dissociés si on utilise des préparations différentes d'antigène $r_4$ obtenues à partir de la toxine $R_2$ brute ou de la toxine $R_2$a (traitée par l'alcool alcalin), l'une étant plus toxique pour l'embryon, mais moins pyrogène pour le lapin que l'autre. En les comparant avec l'endotoxine granulaire [**11**, **12**], on constate la même dissociation ; l'endotoxine granulaire possède un pouvoir pyrogène sensiblement du même ordre de grandeur que celui de l'antigène $r_4$b, alors qu'elle est très peu toxique pour l'embryon de poulet. Ces observations montrent qu'on ne peut assimiler le pouvoir pyrogène à d'autres tests de toxicité.

Ces divers faits : dissociation des symptômes nerveux et intestinaux, de la fièvre et du pouvoir létal pour l'embryon de poulet font penser que les différents symptômes de l'intoxication par l'endotoxine sont dus à différents constituants de celle-ci.

Nowotny et coll. [**33**], étudiant les diverses fractions d'endotoxine séparées par chromatographie, ont également observé des dissociations entre le pouvoir létal pour l'embryon de poulet, la capacité de provoquer le phénomène de Shwartzman, les réactions d'immunodiffusion en gel et l'induction de la résistance non spécifique. Ils attribuent les multiples symptômes toxiques à des constituants différents de l'endotoxine. Ce problème nous paraît capital, car il expliquerait probablement pourquoi il n'a pas encore été possible d'isoler une molécule toxique chimiquement définie rendant compte de tout le tableau clinique de l'intoxication par les endotoxines et d'obtenir des anticorps neutralisants efficaces contre ces endotoxines.

Sans doute, il nous a été possible d'immuniser des souris avec la toxine rough $R_2$ et de les protéger contre l'intoxication par différentes espèces de salmonelles smooth ou rough [**13**], mais cette immunité reste faible et ne protège que contre quelques doses mortelles.

D'autre part, le fait d'inoculer aux animaux le mélange complexe d'antigènes différents que représentent les endotoxines doit empêcher la formation d'anticorps contre certains de ces antigènes. Whang, Neter et coll. [**32**, **49**, **52**] ont montré que l'endotoxine inhibait la formation des anticorps dirigés contre l'antigène commun de Kunin, qui est pourtant bien immunogène si on l'injecte seul. Ils attribuent cette inhibition au lipide A. Nous pensons que ce phénomène joue probablement aussi avec les antigènes hétérologues $r_1$, $r_2$, $r_3$ qui se sont montrés très peu immunogènes.

Nous avons étudié aussi la complexité antigénique des extraits de diverses souches rough et d'autres variantes dégradées. Cette étude fera l'objet d'une prochaine note.

## RÉSUMÉ

Les préparations complexes d'endotoxine extraites des bactéries *S. typhi* rough (souche $R_2$) par une solution hypertonique chlorure et citrate de sodium, ont été digérées par la pronase et fractionnées par filtrations sur gels de Sephadex. Le groupe des antigènes hétérologues $r_1$, $r_2$, $r_3$ et l'antigène $r_4$ ont été isolés et étudiés.

Les antigènes hétérologues sont formés de molécules relativement petites recueillies dans la fraction incluse de la filtration sur Sephadex G-200 et non sédimentables par ultracentrifugation. Communs à toutes les entérobactéries rough ou smooth et distincts de l'antigène commun de Kunin, ils ne prennent aucune part aux réactions d'hémagglutination ; ils sont très peu toxiques et faiblement immunogènes.

L'antigène $r_4$ est exclu sur Sephadex G-200 et sédimente à l'ultracentrifugation. Il est responsable des réactions d'hémagglutination, très toxique, pyrogène et fortement immunogène. L'étude physicochimique et immunologique a montré qu'il présentait une structure complexe et comportait plusieurs déterminants antigèniques. Différents traitements utilisant une hydrolyse ménagée alcaline ou acide ou l'action de l'hydroxylamine ont été expérimentés ; ils ont été accompagnés de fractionnement sur Sephadex. L'étude des fractions par les réactions d'immunodiffusion en gel avec les différents sérums antibactériens et anti-endotoxine ont permis de mettre en évidence une dizaine de déterminants immunologiques différents regroupés sur des fragments de molécules distincts.

## SUMMARY

$r_1$, $r_2$, $r_3$ and $r_4$ antigens from *S. typhi* rough, $R_2$ strain, are isolated after extraction with hypertonic NaCl-citrate solution, pronase digestion, followed by Sephadex G-200 filtration.

The heterologous $r_1$, $r_2$, $r_3$ antigens are lipoproteins of relatively low molecular weight. These antigens are common to all *Enterobacteriaceae* and different from « common antigen » of Kunin. They do not fix on erythrocytes, exhibit very low toxicity and feeble immunogenicity.

The $r_4$ antigen is a heavy molecule (53 S) and is involved in the hemagglutination test. This molecule is highly toxic for chick embryo, rabbit and mouse, pyrogenic and immunogenic for rabbit.

Ten antigenic determinants have been differentiated after alkali or acid treatment or hydroxylaminolysis by immunodiffusion in gel (Ouchterlony test) with anti rough sera.


***

Nous remercions très vivement M^me^ Blass de son aide précieuse pour les chromatographies en couche mince, M. Bizzini pour les analyses d'amino-acides, M. Chedid qui s'est aimablement chargé des expériences sur souris surrénalectomisées, M. Jouannet qui a bien voulu faire les immunoélectrophorèses.

## BIBLIOGRAPHIE


[1] Beckmann (I.), Lüderitz (O.) und Westphal (O.). *Biochem. Z.*, 1964, **339**, 401.

[2] Beckmann (I.), Subbaiah (T. V.) and Stocker (B. A. D.). *Nature*, 1964, **201**, 1299.

[3] Beer (H.), Staehelin (T.), Douglas (H.) and Braude (A. I.). *J. Clin. Invest.*, 1965, **44**, 592.

[4] Bizzini (B.), Digeon (M.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 724.

[5] Bonét-Maury (P.), Jude (A.) et Servant (P.). *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 21.

[6] Butler (W. T.). *J. Immunol.*, 1963, **90**, 663.

[7] Chedid (L.) et Boyer (F.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 239.

[8] Chedid (L.), Boyer (F.) et Saviard (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 213.

[9] Chedid (L.), Skarnes (R. C.) and Parant (M.). *J. exp. Med.*, 1963, **117**, 561.

[10] Chermann (J. C.), Digeon (M.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **112**, 77.

[11] Chermann (J. C.), Digeon (M.), Raynaud (M.) et Giuntini (J). *Ann. Inst. Pasteur,* 1966, **111**, suppl. au n° 5, 59.
[12] Digeon (M.), Chermann (J. C.), Guyot-Jeannin (N.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1966, **111**, suppl. au n° 5, 70.
[13] Digeon (M.) et Raynaud (M.). *C. R. Acad. Sci.,* 1954, **239**, 1718.
[14] Digeon (M.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1957, **92**, 642.
[15] Digeon (M.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1957, **92**, 790.
[16] Digeon (M.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1961, **100**, 344.
[17] Digeon (M.), Raynaud (M.), Lavergne (M.) et Chermann (J. C.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1965, **109**, suppl. au n° 5, 66.
[18] Disch (Z.). *J. biol. Chem.,* 1953, **204**, 983.
[19] Dubois (M.), Gilles (K. A.), Hamilton (J. K.), Rebers (P. A.) and Smith (F.). *Analyt. Chem.,* 1956, **28**, 350.
[20] Flodin (P.). *Thèse,* Uppsala, 1962.
[21] Glueckauf (E.). *Trans Faraday Soc.,* 1955, **51**, 34.
[22] Grollman (A. P.) and Osborn (M. J.). *Biochemistry,* 1964, **3**, 1571.
[23] Horecker (B. L.), Ma (T. S.) and Hass (E.). *J. biol. Chem.,* 1940, **136**, 775.
[24] Kabat (E. A.) and Mayer (M. M.). *Experimental Immunochemistry,* 2e édit., 1961. Charles C. Thomas édit., Springfield, U. S. A.
[25] Knox (K. W.). *Biochem. J.,* 1966, **100**, 73.
[26] Kunin (C. M.). *J. exp. Med.,* 1963, **118**, 565.
[27] Kunin (C. M.), Beard (M. V.) and Halmagyi (E. H.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.,* 1962, **111**, 160.
[28] Landy (M.). *Amer. J. publ. Hlth.,* 1954, **44**, 1059.
[29] Landy (M.), Trapani (R. J.) and Clark (W. R.). *Amer. J. Hyg.,* 1955, **62**, 54.
[30] Lavergne (M.), Mangalo (R.) et Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur,* 1965, **109**, suppl. au n° 5, 94.
[31] Morgan (W. T. J.) and Partridge (S. M.). *Biochem. J.,* 1940, **34**, 169.
[32] Neter (E.), Whang (H. Y.), Lüderitz (O.) and Westphal (O.). *Nature,* 1966, **212**, 420.
[33] Nowotny (A.), Cundy (K. R.), Neale (N. L.), Nowotny (A. M.), Radvany (R.), Thomas (S. P.) and Tripodi (D. J.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 1966, **133**, 586.
[34] Osborn (M. J.). *Proc. nat. Acad. Sci.,* 1963, **50**, 499.
[35] Pon (G.) et Staub (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1952, **34**, 1132.
[36] Randerath (K.). *Thin layer chromatography.* Academic Press, New York et Londres, 1964, **93**.
[37] Raynaud (M.) et Digeon (M.). *C. R. Acad. Sci.,* 1949, **229**, 564.
[38] Raynaud (M.) et Digeon (M.). *C. R. Acad. Sci.,* 1960, **251**, 985.
[39] Raynaud (M.), Digeon (M.) and Chermann (J. C.). *Fed. Proc.,* 1966, **25**, 433.
[40] Raynaud (M.), Digeon (M.), Chermann (J. C.) et Giuntini (J.). *C. R. Acad. Sci.,* 1966, **262**, 722.
[41] Raynaud (M.), Digeon (M.) and Nauciel (C.), in Landy (M.) and Braun (W.). *Bacterial endotoxins,* Institute of Microbiology, The State University, New Brunswick, Rutgers University Press, 1964, **326**.

[42] REBERS (P. A.) and HEIDELBERGER (M.). *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 2415.
[43] REBERS (P. A.) and HEIDELBERGER (M.). *J. Amer. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 3056.
[44] RONDLE (C. J. M.) and MORGAN (W. T. J.). *Biochem. J.*, 1955, **61**, 586.
[45] RUDE (E.) and GOEBEL (W. F.). *J. exp. Med.*, 1962, **116**, 73.
[46] STAUB (A. M.) et COMBES (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 21.
[47] STAVITSKY (A. B.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 360.
[48] SUZUKI (T.), GORZYNSKI (E. A.) and NETER (E.). *J. Bact.*, 1964, **88**, 1240.
[49] SUZUKI (T.), WHANG (H. Y.), GORZYNSKI (E. A.) and NETER (E.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1964, **117**, 785.
[50] WEINBACH (R.) *Schweiz. Z. allg. Pathol.*, 1958, **21**, 1043.
[51] WEISSBACH (A.) and HÜRVITZ (J.). *J. biol. Chem.*, 1959, **234**, 705.
[52] WHANG (H. Y.), LÜDERITZ (O.), WESTPHAL (O.) and NETER (E.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1965, **120**, 371.
[53] WILSON (C. M.). *Analyt. Chem.*, 1959, **31**, 1199.
[54] WITHAKER (J. R.). *Analyt. Chem.*, 1963, **35**, 1950.
[55] WOLLENWEBER (P.). *J. Chromatography*, 1962, **9**, 369.

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette à Paris (France)
*Printed in France.* (71260)